

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 mars 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/19395 A1

(51) Classification internationale des brevets:
A61K 39/07, 39/40, C07K 16/12, A61P 31/04

(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): MOCK,
Michèle [FR/FR]; 40 Boulevard de Reuilly, F-75012
PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02494

(74) Mandataire: CABINET ORES; 6 avenue de Messine,
F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international:
8 septembre 2000 (08.09.2000)

(81) États désignés (national): CA, GB, US.

(25) Langue de dépôt: français

Publiée:

(26) Langue de publication: français

— Avec rapport de recherche internationale.
— Avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel bi-
ologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparé-
ment, et non avec la description.

(30) Données relatives à la priorité:
99/11384 10 septembre 1999 (10.09.1999) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): IN-
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du Docteur Roux,
F-75724 Cedex 15 PARIS (FR).

(54) Title: ACELLULAR IMMUNOGENIC COMPOSITIONS AND ACELLULAR VACCINE COMPOSITIONS AGAINST
BACILLUS ANTHRACIS

(54) Titre: COMPOSITIONS ACELLULAIRES IMMUNOGENES ET COMPOSITIONS ACELLULAIRES VACCINALES
CONTRE *BACILLUS ANTHRACIS*

(57) Abstract: The invention concerns an acellular immunogenic or vaccine composition for producing antibodies against *Bacillus anthracis* comprising a protective antigen (PA) and killed and optionally purified spores, obtained from mutating strains of *Bacillus anthracis* and their uses.

(57) Abrégé: Composition immunogène ou composition vaccinale acellulaire pour la production d'anticorps contre *B. anthracis* comprenant un antigène protecteur (PA) et des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues à partir de souches mutantes de *B. anthracis* et leurs applications.

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/19395 A1

COMPOSITIONS ACELLULAIRES IMMUNOGENES ET COMPOSITIONS ACELLULAIRES VACCINALES CONTRE *BACILLUS ANTHRACIS*

La présente invention concerne des compositions acellulaires immunogènes ainsi que des compositions acellulaires vaccinales contre *Bacillus anthracis*, et leurs applications en médecine humaine et en médecine vétérinaire.

Bacillus anthracis (*B. anthracis*), agent responsable de l'anthrax ou charbon est une bactérie Gram-positive, aérobique et formant des spores.

Cet agent induit une infection soit par inoculation intradermique, soit par ingestion ou inhalation des spores (Klein F. *et al.*, (1966), *J. Infect. Dis.*, 116, 1213-1238 ; Friedlander A.M. *et al.*, (1993), *J. Infect. Dis.*, 167, 1239-1242), dont la transformation en cellules végétatives, formes encapsulées et toxinogènes, permet à la bactérie de proliférer et de synthétiser ses facteurs de virulence.

Les Inventeurs ont récemment montré dans un modèle murin d'une infection pulmonaire par *B. anthracis*, que les macrophages alvéolaires sont le site primaire de la germination, qui est rapidement suivie par l'expression des gènes des toxines, confirmant que la rencontre de la spore avec l'hôte est cruciale pour la pathogénicité de *B. anthracis* (Guidi-Rontani E ; *et al.*, *Molecular Biology*, (1999), 31, 9-17).

Les principaux facteurs de virulence sont :

- la capsule anti-phagocytaire constituée d'acide poly- γ -D-glutamique (Avakyan A. A. *et al.* (1965), *J. of Bacteriology*, 90, 1082-1095) et
- trois facteurs protéiques agissant en combinaison par deux. La toxine oedématogène (PA-EF) induit un oedème après une injection sous-cutanée alors que la toxine létale (PA-LF) est responsable de la mort des animaux après injection intraveineuse (J. W. Ezzell *et al.*, (1984), *Infect. Immun.*, 45, 761-767. Le facteur présent dans les deux combinaisons est l'antigène protecteur (PA) qui intervient dans la fixation des toxines sur les cellules cibles. Les deux autres facteurs, le facteur oedématogène (EF) et le facteur létal (LF) sont responsables de la manifestation de l'effet toxique.

La production simultanée de la capsule et des toxines est indispensable pour la manifestation du pouvoir pathogène.

Les gènes codant pour les enzymes synthétisant la capsule sont portés par le plasmide pXO2 (Green B. D. *et al.*, (1985), *Infect. Immun.*, 49, 291-297 ; Uchida I. *et al.*, (1985), *J. Gen. Microbiol.*, 131, 363-367) et les trois gènes *pag*, *cya*, et *lef*, codant respectivement pour les facteurs PA, EF et LF sont portés par le

plasmide pXO1, qui a été décrit par Mikesell P. *et al.* (*Infect. Immun*, (1983), 39, 371-376).

Alors que de nombreux travaux ont montré que PA est le principal antigène responsable de la protection dans le cadre d'une immunisation naturelle ou acquise par vaccination, les Inventeurs ont montré que LF est également un immuno-
5 gène puissant (Mock M. *Annales de l'Institut Pasteur* décembre 1990).

Afin de clarifier le rôle des composants des toxines dans la toxicité de *B. anthracis*, les Inventeurs ont construit divers mutants. Ainsi, ils ont caractérisé une souche dépourvue du plasmide pXO2 et dépourvue de PA par modification du
10 plasmide pXO1. Du fait de l'absence de PA, cette souche ne présente plus de caractère létal (Cataldi A. *et al.* (1990), *Molecular Microbiology*, 4, 1111-1117).

Pour rechercher les éléments susceptibles d'intervenir dans l'immunisation contre l'infection par *B. anthracis*, les Inventeurs ont construit des mutants, dépourvus d'au moins l'un des facteurs de toxicité responsable de la patho-
15 génicité, c'est-à-dire déficient en PA, en EF ou en LF, voire dépourvus du plasmide pXO1 et dépourvus en plus du plasmide pXO2. Bien que dépourvus de toxicité ou présentant une toxicité atténuée, les mutants simples, notamment RP9 (EF) (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-1094 en date du 2 mai 1991) et RP10 (LF) (Collection Nationale de
20 Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-1095 en date du 2 mai 1991), et le double mutant RP 42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999), se sont révélés aptes à produire des anticorps immunoprotecteurs contre une infection par une souche Sterne sauvage. Ces mutants sont décrits dans la
25 demande Internationale n° 92/19720, et dans les articles de Pezard C. *et al.*, (*Infection and Immunity*, (1991), 59, 3472-3477 et *J. General Microbiology*, (1993), 139, 2459-2463).

Actuellement, le vaccin vétérinaire commercialisé (Merial[®]) est un vaccin vivant composé d'une suspension de spores de la souche Sterne de *B.*
30 *anthracis*. Son efficacité protectrice chez l'animal varie selon les lots, sans que les causes de ces variations puissent être déterminées.

Cette efficacité aléatoire, des effets secondaires ainsi que le risque de dissémination potentielle de germes vivants dans l'environnement rendent son utilisation chez l'homme impossible.

35 En médecine humaine, deux vaccins contre la maladie du charbon, essentiellement développés en Angleterre et aux Etats-Unis sont utilisés. Il s'agit de vaccins acellulaires constitués principalement de l'antigène protecteur (PA), préparé à

partir de surnageants de culture de la souche toxigène Sterne de *B. anthracis* et d'un adjuvant pouvant être utilisé en médecine humaine, l'hydroxyde d'alumine.

Des études récentes sur ces deux vaccins ont montré que le vaccin anglais, contenant des traces de EF et de LF induisant une réponse anticorps en ELISA, était plus efficace sur le cobaye que le vaccin américain, apparemment
5 dépourvu de ces deux composants (Turnbull P.C. *et al.* (1991), *Vaccine*, 9, 533-539).

Toutefois ces deux vaccins présentent un certain nombre d'inconvénients :

- le protocole de vaccination est contraignant, car il nécessite six
10 injections en dix-huit mois, suivies d'un rappel par an,
- ils induisent des effets secondaires néfastes qui rendent leur utilisation limitée,
- la protection induite par ces vaccins acellulaires chez l'animal, envers un test d'épreuve avec une souche virulente, n'est jamais totale, contrairement
15 à celle obtenue avec le vaccin vivant.

Compte tenu de l'importance des infections causées par *B. anthracis*, de nombreux travaux sont actuellement consacrés à l'amélioration du vaccin afin qu'il ne présente pas les inconvénients exposés ci-dessus, tout en présentant la même protection que le vaccin vivant.

20 Dans ce cadre, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à un vaccin acellulaire fiable, efficace, dépourvu d'effets secondaires qui pallie les inconvénients des vaccins existants et dont les propriétés vaccinales soient faciles à contrôler.

La présente invention a en conséquence pour objet une composition
25 immunogène acellulaire, apte à induire une réponse immunitaire contre les infections à *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un antigène protecteur (PA),
 - des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi
30 les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2,
- associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite
35 composition immunogène acellulaire est apte à produire des anticorps contre *B. anthracis*.

La présente invention a également pour objet une composition vaccinale acellulaire contre *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un antigène protecteur (PA),
 - des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir
- 5 de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable et à au moins un
- 10 adjuvant.

Au sens de la présente invention, le terme acellulaire signifie que la composition immunogène ou vaccinale ne contient plus de cellules viables (spores tuées).

Les adjuvants utilisés sont des adjuvants classiquement utilisés et

15 seront notamment, soit la saponine dans le cas du vaccin vétérinaire, soit avantageusement choisis dans le groupe constitué par l'hydroxyde d'alumine et le squalène, dans le cas du vaccin humain.

Dans le cadre de la présente invention, les spores peuvent être tuées par tout moyen physique ou chimique conduisant à leur inactivation. A titre d'exemple

20 on peut citer le traitement au formaldéhyde ou l'irradiation.

Au sens de la présente invention, on entend par mutation une délétion, une modification ou une addition au niveau du gène concerné, qui résulte soit en un gène dépourvu de sa capacité à produire la protéine correspondante, soit apte à produire une protéine inactive.

25 Selon un mode de réalisation particulier de l'Invention, les compositions immunogènes et les compositions vaccinales peuvent comprendre en outre au moins une exotoxine détoxifiée choisie notamment dans le groupe constitué par le facteur léthal (LF) et le facteur oedématogène (EF) détoxifiés, c'est-à-dire ayant perdu leurs propriétés toxiques.

30 Ces facteurs protéiques inactivés peuvent notamment être obtenus par expression des gènes mutés au niveau de la séquence codant pour le site actif desdits facteurs protéiques (*cya* ou *lef*).

Les compositions immunogènes et vaccinales selon l'Invention possèdent, de manière surprenante, un fort pouvoir protecteur, de l'ordre

35 de 100 %, nettement supérieur à celui obtenu avec le PA seul ou les spores tuées seules, ce qui permet d'avoir une immunisation complète avec une seule injection

dans les conditions du vaccin vétérinaire et deux injections dans les conditions du vaccin à usage humain.

Selon un autre mode de réalisation avantageux des compositions immunogènes et vaccinales selon l'invention, les spores sont issues d'une souche de
5 *B. anthracis* choisie dans le groupe constitué par les souches suivantes : Sterne 7702 (M. Sterne *J. Vet. Sci. Anima. Indust.*, (1939), 13, 315-317), RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999) et RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du
10 28 juillet 1999).

Dans un autre mode de réalisation avantageux des compositions immunogènes et vaccinales selon l'invention, l'antigène protecteur est choisi dans le groupe constitué par les antigènes protecteurs purifiés, issus de n'importe quelle souche Sterne sauvage ou mutée de *B. anthracis*, et les antigènes protecteurs recombi-
15 nants, notamment celui produit par *B. subtilis*.

De manière avantageuse, l'antigène protecteur est issu de la souche RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

La présente invention a également pour objet la souche RPLC2
20 déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un anticorps dirigé contre les spores issues de souches, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi
25 les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive. En effet les antibiotiques sont le seul traitement actuel contre le charbon et doivent être administrés précocement, avant
30 l'apparition du choc toxique. En conséquence une sérothérapie visant à la fois les toxines et la germination des spores serait un bon complément.

Les anticorps peuvent être des anticorps polyclonaux obtenus par immunisation d'un animal approprié avec les spores issues de souches utilisées pour la préparation des compositions selon l'invention, dans des conditions habituelles de
35 préparation de tels anticorps.

Les anticorps peuvent être des anticorps monoclonaux obtenus de manière connue en soi, notamment par fusion des cellules spléniques de souris immu-

nisées avec un antigène consistant en des spores issues de souches utilisées pour la préparation des compositions selon l'invention.

La présente invention a également pour objet des préparations antigéniques purifiées, caractérisées en ce qu'elles sont issues de spores de *B. anthracis*, et comprennent par exemple un ou plusieurs des exoantigènes (protéines de spores et de l'exosporium) de poids moléculaires respectifs 15 kDa, 30 kDa, 55 kDa, et supérieur à 200 kDa, lesdits poids moléculaires étant déterminés par l'utilisation de la trousse AMERSHAM® LMW Electrophoresis Calibration Kit.

Conformément à l'invention, ces compositions antigéniques sont obtenues par des techniques classiques connues de l'homme du métier.

La présente invention a de plus pour objet les anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre lesdites compositions antigéniques.

Les compositions immunogènes et vaccinales selon l'invention peuvent être administrées, seules ou en combinaison avec d'autres vaccins, par injection ou par toute voie habituellement utilisée pour la vaccination.

Les doses à administrer seront déterminées en fonction de l'animal ou de la personne que l'on cherche à protéger.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et des exemples illustrés par les figures dans lesquelles :

- la figure 1 représente l'analyse par immunoblot des protéines de la spore selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 5,
- la figure 2 représente l'analyse par immunoblot des protéines de l'exosporium (A) révélée par un anticorps polyclonal et un anticorps monoclonal (35B8) (B) analysée selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 5,
- la figure 3 représente les différentes souches de *B. anthracis* utilisées pour préparer la souche RPLC2. La souche RPLC2 produit les composants des toxines inactivés par mutations ponctuelles dans les sites actifs des protéines LF (LF686 ; H686→A) et EF (EF346/353 ; K346→Q et K353→Q). Dans cette figure, les nombres qui suivent Δ indiquent les nucléotides auxquels les délétions commencent et finissent ; Erm, Kan et Sps indiquent l'insertion de cassettes de résistance à l'érythromycine, à la kanamycine et à la spectinomycine ; Ø correspond à un organisme qui ne présente pas de résistance à ces antibiotiques.

EXEMPLE 1 : Matériel et méthode pour la préparation des compositions selon l'invention.

1.1. Construction de la souche RPLC2

La souche RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28

juillet 1999) est construite à partir des souches indiquées dans la figure 3, selon les principes opératoires décrits par Pezard C. *et al.* (1993) (référence citée).

1.2. Préparation du PA

La protéine PA est préparée à partir de la souche mutante de *B. anthracis* RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

Les surnageants de culture en milieu R (Ristroph J. D. *et al.* (1983), *Infection and Immunity*, 39, 483-486) sont filtrés puis concentrés sur un système Minitan® (membrane Millipore® PLGC OMP).

L'antigène PA est ensuite purifié par chromatographie ultra-rapide (FPLC) sur colonne monoQ® selon le protocole décrit par Pezard C. *et al.* (1993) (référence citée).

1.3. Préparation et inactivation des spores

Les spores sont préparées à partir de la souche Sterne 7702 selon le mode opératoire décrit par Guidi-Rontani E *et al.* (1999) (référence citée).

Les spores sont préparées sur un milieu solide NBY, puis lavées à l'eau distillée. Elles sont inactivées par traitement au formol, à une concentration finale de 4 %, pendant 3 heures à 37 °C.

Après lavage par centrifugation, les spores sont reprises dans le volume initial de sérum physiologique (concentration finale de 10⁹ spores/ml).

Cette suspension est utilisée pour réaliser l'immunisation.

Si nécessaire, notamment lorsque l'on veut préparer un vaccin à usage humain, les spores peuvent être purifiées avant le traitement au formol sur un gradient de Radioselectran® (Schering S.A.) de 50 % à 76 %.

1.4. Préparation des compositions vaccinales

Les compositions sont préparées soit à partir de spores tuées seules préparées selon le mode opératoire décrit en 1.3, soit à partir d'un mélange de PA (à une concentration telle qu'on injecte 10 µg par souris) et de spores tuées (10⁸ spores par souris), auxquels on ajoute comme adjuvant soit de l'hydroxyde d'alumine à une concentration finale de 0,3 %, soit de la saponine à une concentration finale de 0,05 %.

1.5. Protocole de traitement des souris

On utilise des souris Swiss femelles de six semaines fournies par la Société Iffa-Credo (BP0102 - 69592 L'ARBRESLE-Cedex).

Les animaux sont répartis en groupe de six et nourris *ad libitum*.

Les injections sont faites par voie sous-cutanée au niveau de l'aîne sous un volume de 200 µl.

1.6. Mesure des taux d'anticorps

Les taux d'anticorps sont mesurés par un test ELISA classique.

EXEMPLE 2 : Effet de deux immunisations dans les conditions du vaccin acellulaire humain (protocole n° 1)

5 2.1. Traitement des animaux

Le protocole d'injections pour chaque groupe est le suivant :

- deux injections de compositions vaccinales préparées comme indiqué au point 1.4. ou d'adjuvant (hydroxyde d'alumine) sont réalisées à 28 jours d'intervalles et
- 10 - une injection d'épreuve est réalisée au 43^{ième} jour avec la souche virulente 17JB de *B. anthracis* (souche de référence Pasteur n° 2) fournie par la Société Rhône-Mérieux.

Quatre groupes d'animaux sont immunisés selon ce protocole comme suit :

- 15 - le premier groupe reçoit l'hydroxyde d'alumine seule (groupe témoin),
- le second groupe reçoit une dose de PA de 10 µg par souris,
- le troisième groupe reçoit les spores seules à raison de 10⁸ spores par souris et
- 20 - le quatrième groupe reçoit le mélange PA + spores tuées de manière à avoir 10 µg de PA et 10⁸ spores par souris.

Tous les groupes reçoivent au 43^{ième} jour, comme précisé ci-dessus, une dose d'épreuve correspondant à 30 fois la DL50, soit 1,5 x 10⁴ spores par souris.

2.2. Résultats

25 Les taux de survie sont donnés dans le Tableau I ci-dessous.

TABLEAU I

| Traitement | Nombre de morts au 43 ^{ième} jour | Pourcentage de survie au 43 ^{ième} jour |
|---------------------|---|---|
| Adjuvant seul | 6/6 | 0 % |
| PA seul | 3/6 | 50 % |
| Spores tuées seules | 2/6 | 33 % |
| PA + spores tuées | 0/6 | 100 % |

Ces résultats montrent clairement que seules les compositions vaccinales selon l'invention sont aptes à permettre une protection complète.

EXEMPLE 3 : Effet de deux immunisations dans les conditions du vaccin à usage humain (protocole n° 2)

5 3.1. Traitement des animaux

Le protocole d'injections pour chaque groupe est le suivant :

- deux injections de compositions vaccinales préparées comme indiqué au point 1.4. ou d'adjuvant (hydroxyde d'alumine) sont réalisées à 21 jours d'intervalles et
- 10 - une injection d'épreuve est réalisée au 32^{ième} jour avec la souche virulente 17JB de *B. anthracis* (souche de référence Pasteur n° 2) fournie par la Société Rhône-Mérieux.

Quatre groupes d'animaux sont immunisés selon ce protocole comme suit :

- 15 - le premier groupe reçoit l'hydroxyde d'alumine seule,
- le second groupe reçoit une dose de PA de 10 µg par souris,
- le troisième groupe reçoit les spores seules à raison de 10⁸ spores par souris et
- le quatrième groupe reçoit le mélange PA + spores tuées de
- 20 manière à avoir 10 µg de PA et 10⁸ spores par souris.

Tous les groupes reçoivent, au 32^{ième} jour, comme précisé ci-dessus, une dose d'épreuve correspondant à 100 fois la DL50, soit 1,5 x 10⁴ spores par souris.

3.2. Résultats

3.2.1. *Taux de survie*

25 Les résultats sont donnés dans le Tableau II ci-dessous.

TABLEAU II

| Traitement | Nombre de morts au 32 ^{ième} jour | Pourcentage de survie au 32 ^{ième} jour |
|---------------------|---|---|
| Adjuvant seul | 6/6 | 0 % |
| PA seul | 1/6 | 83 % |
| Spores tuées seules | 1/7 | 85 % |
| PA + spores tuées | 0/6 | 100 % |

Ces résultats montrent clairement que seules les compositions vaccinales selon l'invention sont aptes à permettre une protection complète.

3.2.2. Taux d'anticorps

Les taux d'anticorps dirigés contre les spores sont élevés, de l'ordre
5 de 10 000 à 15 000, et identiques dans les deux groupes qui les ont reçues, que ces spores soient seules ou associées à PA.

Ces résultats confirment l'effet de synergie des compositions selon l'invention, qui, avec un taux d'anticorps identique à celui obtenu par injection des spores tuées seules, permettent une protection complète.

10 **EXEMPLE 4 : Comparaison de l'efficacité des compositions vaccinales selon l'invention avec le vaccin vivant Sterne dans les conditions du vaccin à usage vétérinaire (une seule injection en utilisant la saponine comme adjuvant) : épreuve avec souche 17JB.**

4.1. Traitement des animaux

15 Le protocole d'injections pour chaque groupe est le suivant :

- une injection de compositions vaccinales préparées comme indiqué
au point 1.4. ou de saponine est réalisée à J0 et

- une injection d'épreuve est réalisée au 32^{ème} jour avec la souche
virulente 17JB de *B. anthracis* (souche de référence Pasteur n° 2) fournie par la
20 Société Rhône-Mérieux.

Cinq groupes d'animaux sont immunisés selon ce protocole comme
suit :

- le premier groupe reçoit la saponine seule (groupe témoin),
- le second groupe reçoit une dose de PA de 10 µg par souris,
25 - le troisième groupe reçoit les spores seules à raison de 10⁸ spores
par souris,

- le quatrième groupe reçoit le mélange PA + spores tuées de
manière à avoir 10 µg de PA et 10⁸ spores par souris et

- le cinquième groupe reçoit le vaccin vivant Sterne préparé à
30 l'Institut Pasteur.

Tous les groupes reçoivent une dose d'épreuve correspondant à 100
fois la DL50, soit 10⁵ spores au 32^{ème} jour.

4.2. Résultats

Ils sont donnés dans le Tableau III ci-dessous.

TABLEAU III

| Traitement | Nombre de morts au 32 ^{ème} jour | Pourcentage de survie au 32 ^{ème} jour |
|---------------------|--|--|
| Adjuvant seul | 6/6 | 0 % |
| PA seul | 1/6 | 83 % |
| Spores vivantes | 0/6 | 100 % |
| Spores tuées seules | 4/6 | 33 % |
| PA + spores tuées | 0/6 | 100 % |

Ces résultats montrent clairement que les compositions vaccinales selon l'invention sont aussi efficaces que le vaccin vivant et pourraient par conséquent être avantageusement utilisées comme vaccin vétérinaire.

EXEMPLE 5 : Analyse par immunoblot des protéines de spores de *B. anthracis*

5.1. Matériel et méthode

5.1.1. Préparation des anticorps polyclonaux et monoclonaux.

Un sérum polyclonal de souris immunisées avec des spores tuées issues, par exemple, de la souche RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999) est préparé selon des techniques classiques et connues de l'homme du métier.

L'anticorps monoclonal spécifique de la surface de la spore (35B8) est préparé selon la technique décrite par Kohler *et al.*, (1975), *Nature*, 296, 495-497.

5.1.2. Extraction des spores

Les protéines de la spore sont solubilisées par traitement des spores avec un tampon Tris-HCl à pH 9,8 contenant 8 M d'urée et 2 % de SDS ou avec un tampon Tris 10 mM à pH 9,5 contenant 10 mM d'EDTA et 1 % de SDS, selon la technique décrite par Garcia-Patrone, (1995), *Molecular and Cellular Biochem.*, 145, 29-37).

5.2. Résultats

Ils sont illustrés à la figure 1 et à la figure 2.

Le sérum polyclonal de souris reconnaît 3 espèces protéiques de poids moléculaire respectifs 15 kDa, 30 kDa, 55 kDa et une espèce protéique de poids moléculaire supérieur à 200 kDa. (Figure 1).

L'espèce la plus lourde est également reconnue par l'anticorps monoclonal 35B8 et semble appartenir à l'exosporium (Figure 2A).

En effet l'analyse par immunoblot des protéines de l'exosporium montre que les différents anticorps monoclonaux utilisés, dont 35B8, reconnaissent une espèce protéique de poids moléculaire supérieur à 200 kDa (Figure 2A).

Il ressort de ce qui précède que les compositions vaccinales selon l'invention sont aptes à permettre une protection complète aussi bien dans les conditions du vaccin humain que du vaccin vétérinaire.

EXEMPLE 6 : Comparaison de l'efficacité des compositions vaccinales selon l'invention administrées selon le protocole n° 1 de l'Exemple 2, avec l'antigène PA seul, chez la souris ou chez le cobaye : épreuve avec la souche 9602.

10 A. Souris Swiss

6.1. Traitement des animaux :

Le protocole d'injection pour chaque groupe est le suivant :

- deux injections des compositions vaccinales préparées comme indiqué au point 1.4 dans l'exemple 1 sont réalisées à 15 jours d'intervalle (J0 et J15),
15 et

- une injection d'épreuve est réalisée au 35^{ème} jour avec le souche virulente 9602 (M. Berthier et al., Lancet, 1996, 347, 9004:828) isolée à partir d'un cas mortel de charbon humain et dont la virulence est dix fois supérieure à celle de la souche 17JB utilisée dans les exemples précédents ; ladite souche est injectée en sous-cutanée.
20

4 groupes d'animaux tels que définis à l'exemple 2 sont immunisés selon ce protocole.

Tous les groupes reçoivent au 35^{ème} jour, comme précisé ci-dessus, une dose d'épreuve correspondant à 30 fois la DL50, soit $1,5 \times 10^4$ spores par souris.

25 6.2. Résultats

Les expériences ont été répétées 3 fois, avec des préparations différentes, sur des lots de 6 à 8 souris par point (pour raison de confinement P3).

Les taux de survie sont illustrés dans le Tableau IV ci-après.

TABLEAU IV

30

| Traitement | Pourcentage de survie au 35 ^{ème} jour et jusqu'au 43 ^{ème} jour |
|---------------------|--|
| Adjuvant seul | 0 % |
| PA seul | 0 % |
| Spores tuées seules | 0 % |
| PA + spores tuées | 100 % |

B. Cobayes.

Les expériences ont été réalisées 2 fois, sur des lots de 5 cobayes. Le protocole est similaire à celui utilisé chez la souris, à l'exception des points suivants :

- les doses de PA sont de 40 µg par animal,
- 5 - l'injection d'épreuve est réalisée par voie intramusculaire.

On obtient 100 % de survivants pour la combinaison selon l'invention, spores tuées + PA, contre 40 % chez les animaux recevant PA seul, composition du vaccin classique.

6.3. Taux d'anticorps.

- 10 Ces expériences (souris et cobayes) ont été accompagnées du suivi de la réponse en anticorps par ELISA sur des échantillons de sérum de souris et de cobayes. Les titres en anticorps envers PA sont élevés (> 5000) ; une réponse du même ordre est détectée envers des antigènes spécifiques de la spore.

- 15 **EXEMPLE 7 : Comparaison de l'efficacité des compositions vaccinales selon l'invention avec le vaccin vivant Sterne dans les conditions du vaccin à usage vétérinaire telles que décrites à l'Exemple 4 (épreuve avec souche 9602).**

- 20 Le test a été réalisé sur souris Swiss (dans les conditions décrites à l'Exemple 4). L'injection d'épreuve est réalisée avec la souche 9602 (M. Berthier et al., précité) chez des souris ayant reçu une seule injection, soit de spores vivantes (RPLC2), soit de la combinaison selon l'invention, spores tuées + PA. L'efficacité de protection, de 83 %, est identique pour les deux lots.

Ces résultats montrent clairement qu'il est possible de protéger à 100 % des souris et des cobayes avec une combinaison vaccinale comportant des spores tuées et de l'antigène PA.

REVENDEICATIONS

1. Composition immunogène acellulaire, apte à induire une réponse immunitaire contre les infections à *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un antigène protecteur (PA),
- 5 - des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2,
- 10 associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

2. Composition immunogène acellulaire selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est apte à produire des anticorps contre *B. anthracis*.

3. Composition vaccinale acellulaire contre *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 15 - un antigène protecteur (PA),
- des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis*
- 20 dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2,
- associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable et à au moins un adjuvant.

4. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, ou composition vaccinale selon la revendication 3, caractérisée en ce

25 qu'elle comprend en outre au moins une exotoxine détoxifiée choisie dans le groupe constitué par le facteur léthal (LF) et le facteur oedématogène (EF) détoxifiés.

5. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, ou composition vaccinale selon la revendication 3, caractérisée en ce que les spores sont issues d'une souche de *B. anthracis* choisie dans le groupe constitué par les souches suivantes : Sterne 7702, RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en

30 date du 28 juillet 1999) et RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

6. Composition immunogène ou composition vaccinale selon l'une

35 quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'antigène protecteur est choisi dans le groupe constitué par les antigènes protecteurs purifiés, issus de

n'importe quelle souche Sterne sauvage ou mutée de *B. anthracis*, et les antigènes protecteurs recombinants.

7. Composition immunogène ou composition vaccinale selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'antigène protecteur est issu de la souche
5 RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

8. Souche RPLC2 déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999.

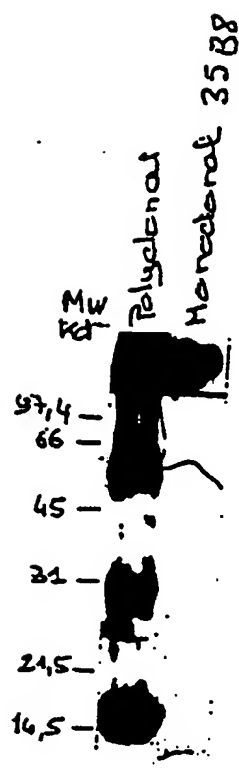
10 9. Utilisation d'au moins un anticorps dirigé contre les spores issues de souches obtenues, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de
15 souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive.

10. Préparations antigéniques purifiées, caractérisées en ce qu'elles sont issues de spores de *B. anthracis* et comprennent un ou plusieurs des exoantigènes de poids moléculaires respectifs 15 kDa, 30 kDa, 55 kDa, et supérieur à 200 kDa.

11. Anticorps dirigés contre les préparations antigéniques selon la
20 revendication 10.

1/3

FIGURE 1



2/3

FIGURE 2



FIGURE 3

| Souche | Génotype | Résistance à un antibiotique | Facteurs produits | | | Souche parentale |
|--------------------|---|---------------------------------|-------------------|-------|-----------|---------------------------------------|
| | | | PA | LF | EF | |
| 7702 | pXOI | Ø | | | | Souche Sterne (Collection Pasteur) |
| RPA | pXOI- <i>mgA</i> (1805-2871) | Spe | — | LF | EF | 7702 |
| RPA200 | pXOI- <i>mgA</i> (1805-4105) | Erm | — | LF | EF | 7702 |
| RPL | pXOI- <i>leA</i> (2105-2970) | Spe | PA | — | EF | 7702 |
| RPL200 | pXOI- <i>leA</i> (405-2911) | Erm | PA | — | EF | 7702 |
| RPE | pXOI- <i>cynA</i> (400-2311) | Spe | PA | LF | — | 7702 |
| RPE346 | pXOI- <i>cynA</i> 346/353 | Ø | PA | LF | EF346/353 | RPE |
| RPL686 | pXOI- <i>leA</i> 686 | Ø | PA | LF686 | EF | RPL |
| RPL686Δ <i>cya</i> | pXOI- <i>cynA</i> (1414-2420) | Kan | PA | LF686 | | RPL686 |
| RPLC2 | pXOI- <i>leA</i> 686- <i>cynA</i> 346/353 | Ø | PA | LF686 | EF346/353 | RPL686Δ <i>cyn</i> |
| RPA163 | pXOI- <i>mgA</i> (2374-2394) | Ø | PA163 | LF | EF | RPA |
| RPA313 | pXOI- <i>mgA</i> (2826-2933) | Ø | PA313 | LF | EF | RPA |
| RPA705 | pXOI- <i>mgA</i> (4005-4053) | Ø | PA705 | LF | EF | RPA200 |
| RPA608 | pXOI- <i>mgA</i> 608 | Ø | PA608 | LF | EF | RPA200 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/02494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/07 A61K39/40 C07K16/12 A61P31/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C12N C12R C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | DATABASE WPI Section Ch, Week 200007 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-084616 XP002141827 & RU 2 115 433 C (MICROBIOLOGY RES INST), 20 July 1998 (1998-07-20) abstract | 1-7 |
| X | WO 92 19720 A (PASTEUR INSTITUT) 12 November 1992 (1992-11-12) claims 1-5 & FR 2 676 068 A 6 November 1992 (1992-11-06) cited in the application --- -/-- | 8,10,11 |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 December 2000

Date of mailing of the international search report

13/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02494

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | EP 0 739 981 A (UNIV BRUXELLES) 30 October 1996 (1996-10-30) claim 18 --- | 9 |
| X | WELKOS S L FRIEDLANDER A M: "Comparative safety and efficacy against Bacillus anthracis of protective antigen and live vaccines in mice" MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 5, no. 2, 1988, pages 127-140, XP000922808 --- | 9 |
| A | the whole document | 1-11 |
| X | TURNBULL P C B: "ANTHRAX VACCINES: PAST, PRESENT AND FUTURE" VACCINE, vol. 9, no. 8, 1 August 1991 (1991-08-01), pages 533-539, XP000215550 cited in the application table 3 --- | 8 |
| A | the whole document | 1-11 |
| A | STEPANOV A V ET AL: "Development of novel vaccines against anthrax in man" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, no. 1, 26 January 1996 (1996-01-26), pages 155-160, XP004036861 --- | |
| A | ABALAKIN V A ET AL.: "Protective and other biological properties of Bacillus anthracis soluble antigen" JOURNAL OF HYGIENE, EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 35, no. 1, 1991, pages 83-91, XP000922839 the whole document --- | 10 |
| A | ABALAKIN V A ET AL.: "Vlianië protektivnogo antigena Bacillus anthracis na formirovanië immuniteta pod deistviem sibireiazvennykh jivvykh vaktsin" ZHURNAL MIKROBIOLOGII, EPIDEMIOLOGII I IMMUNOLOGII, no. 5, 1990, pages 72-75, XP002141826 the whole document ----- | 10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02494

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|---|--|
| RU 2115433 C | 20-07-1998 | NONE | |
| WO 9219720 A | 12-11-1992 | FR 2676068 A EP 0537342 A US 5840312 A | 06-11-1992 21-04-1993 24-11-1998 |
| EP 0739981 A | 30-10-1996 | AU 5647896 A WO 9634103 A EP 0822985 A JP 11503918 T | 18-11-1996 31-10-1996 11-02-1998 06-04-1999 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. e internationale No

PCT/FR 00/02494

| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K39/07 A61K39/40 C07K16/12 A61P31/04 | | |
|---|--|--|
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K C12N C12R C07K | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | DATABASE WPI Section Ch, Week 200007 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-084616 XP002141827 & RU 2 115 433 C (MICROBIOLOGY RES INST), 20 juillet 1998 (1998-07-20) abrégé | 1-7 |
| X | --- WO 92 19720 A (PASTEUR INSTITUT) 12 novembre 1992 (1992-11-12) revendications 1-5 & FR 2 676 068 A 6 novembre 1992 (1992-11-06) cité dans la demande --- -/-- | 8,10,11 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe | | |
| * Catégories spéciales de documents cités: | | |
| "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée | | |
| "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "8" document qui fait partie de la même famille de brevets | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 6 décembre 2000 | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 13/12/2000 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Fonctionnaire autorisé Teyssier, B |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 00/02494

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | EP 0 739 981 A (UNIV BRUXELLES) 30 octobre 1996 (1996-10-30) revendication 18 --- | 9 |
| X | WELKOS S L FRIEDLANDER A M: "Comparative safety and efficacy against Bacillus anthracis of protective antigen and live vaccines in mice" MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 5, no. 2, 1988, pages 127-140, XP000922808 --- | 9 |
| A | le document en entier --- | 1-11 |
| X | TURNBULL P C B: "ANTHRAX VACCINES: PAST, PRESENT AND FUTURE" VACCINE, vol. 9, no. 8, 1 août 1991 (1991-08-01), pages 533-539, XP000215550 cité dans la demande tableau 3 --- | 8 |
| A | le document en entier --- | 1-11 |
| A | STEPANOV A V ET AL: "Development of novel vaccines against anthrax in man" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, no. 1, 26 janvier 1996 (1996-01-26), pages 155-160, XP004036861 --- | |
| A | ABALAKIN V A ET AL.: "Protective and other biological properties of Bacillus anthracis soluble antigen" JOURNAL OF HYGIENE, EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 35, no. 1, 1991, pages 83-91, XP000922839 le document en entier --- | 10 |
| A | ABALAKIN V A ET AL.: "Vlianië . protektivnogo antigena Bacillus anthracis na formirovanië immuniteta pod deistviem sibireiazvennykh jivvykh vaktsin" ZHURNAL MIKROBIOLOGII, EPIDEMIOLOGII I IMMUNOLOGII, no. 5, 1990, pages 72-75, XP002141826 le document en entier ----- | 10 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Derr. e Internationale No
PCT/FR 00/02494

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|--|
| RU 2115433 C | 20-07-1998 | AUCUN | |
| WO 9219720 A | 12-11-1992 | FR 2676068 A EP 0537342 A US 5840312 A | 06-11-1992 21-04-1993 24-11-1998 |
| EP 0739981 A | 30-10-1996 | AU 5647896 A WO 9634103 A EP 0822985 A JP 11503918 T | 18-11-1996 31-10-1996 11-02-1998 06-04-1999 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.